

Aumento da tolerância da *Komagataella phaffii* à inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos

Brandalise, E. F^{1*}; Duarte-Brandão, L. T¹; Almeida, J. R. T¹;

¹Embrapa Agroenergia. *E-mail: edubrandalisee@gmail.com

Resumo: Os carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica podem ser utilizados como fonte de carbono e energia pelos microrganismos. Entretanto, para que esses açúcares possam ser utilizados no processo industrial, é necessário submeter a biomassa aos processos de pré-tratamento. Os processos de pré-tratamento facilitam a liberação de açúcares fermentáveis da biomassa; no entanto, eles também levam à formação e liberação de compostos que inibem o metabolismo microbiano, dentre eles, o furfural e o 5- hidroximetil-furfural (HMF). O mecanismo de resposta natural das leveduras relaciona-se com a modulação poligênica de várias vias metabólicas e a expressão diferencial de genes, que redireciona o metabolismo da levedura para permitir o reparo dos danos causados pelos inibidores e aumentar as atividades de desintoxicação inatas. Desta forma, a identificação e utilização da expressão destes genes, por meio de engenharia genética, em linhagens de leveduras, apresentam um elevado potencial para aplicação bioenergética. O objetivo deste trabalho foi desenvolver linhagens transformadas da levedura *Komagataella phaffii* tolerantes a inibidores presentes em hidrolisados de biomassa. Para tanto, seis genes-alvo foram selecionados a partir de análises de transcriptoma da *K. phaffii* na presença de compostos inibitórios presentes no hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar. Os seis genes foram clonados no vetor de expressão pKLD, sob controle do promotor PGK1 para expressão constitutiva, empregando-se estratégias de recombinação homóloga. Após a construção dos vetores, estes foram utilizados para transformar a linhagem *K. phaffii*-X33. Após seleção em placa contendo antibiótico, linhagens recombinantes contendo cada um dos genes foram confirmadas por PCR. O plasmídeo pKLD sem nenhum gene sendo superexpresso foi utilizado para obter uma linhagem controle. As linhagens recombinantes foram avaliadas quanto à tolerância a HMF, furfural e hidrolisado de biomassa de cana. Os dados demonstraram a capacidade de alguns genes aumentarem a capacidade de destoxificação do meio e o consequente melhor crescimento da linhagem transformada mesmo na presença dos inibidores. Das 6 linhagens transformadas obtidas, duas apresentaram menor período de adaptação, de 14 horas, em relação à linhagem controle, que necessitou 20 horas para ultrapassar a fase lag de crescimento, em furfural 2 g/L e em hidrolisado 30%. Ademais, uma destas linhagens transformadas demonstrou uma taxa de crescimento 42,6% maior em furfural 2 g/L do que a mesma taxa na linhagem controle. Assim,

a superexpressão de genes selvagens da *K. phaffii* permitiu a construção de linhagens mais tolerantes aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico para aplicação em bioprocessos.

Palavras-chave: Bioprocessos; Engenharia genética; Leveduras.

Referências:

Hasunuma, Tomohisa, and Akihiko Kondo. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. **Biotechnology advances** 30.6 (2012): 1207-1218.

Jönsson, Leif J., and Carlos Martín. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology** 199 (2016): 103-112.

Paes, Barbara G., *et al.* Physiological characterization and transcriptome analysis of *Pichia pastoris* reveals its response to lignocellulose-derived inhibitors. **AMB Express** 11.1 (2021b): 1-15.